美棘蓟马体内 *Wolbachia* 感染的时空分布

张晓晨, 冯纪年*

(西北农林科技大学, 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】明确共生菌 *Wolbachia* 在美棘蓟马 *Echinothrips americanus* 体内的时空分布动态。【方法】基于 *Wolbachia* 的外膜蛋白基因(*wsp*)序列设计特异引物构建标准质粒, 用绝对荧光定量 PCR 的方法测定美棘蓟马不同发育阶段(卵、若虫、预蛹、蛹、成虫)和雌雄成虫不同组织(头、胸、腹、腹末 3 节)中 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因拷贝数,分析美棘蓟马共生菌 *Wolbachia* 的感染情况。【结果】美棘蓟马体内 *Wolbachia* 拷贝数随美棘蓟马发育进程逐渐增大,雌性成虫期 *Wolbachia* 拷贝数显著高于卵和若虫期;雌雄成虫不同组织中的拷贝数存在差异,雌性成虫腹部 *Wolbachia* 拷贝数显著高于头部、胸部和腹末 3 节,雄性成虫胸部和腹部 *Wolbachia* 拷贝数显著高于头部和腹末 3 节。美棘蓟马性别和组织与体内 *Wolbachia* 拷贝数存在显著的交互作用。【结论】本研究结果表明,美棘蓟马体内的 *Wolbachia* 感染状态不仅受宿主发育阶段的影响,而且与性别及分布位置有很大关系,为进一步了解该蓟马的发生、定植和扩散机理提供理论依据。

关键词: 美棘蓟马; *Wolbachia*; *wsp*; 时空分布; 感染密度; 绝对荧光定量 PCR

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)07-0843-08

Temporal and spatial distribution of *Wolbachia* infection in the poinsettia thrips, *Echinothrips americanus* (Thysanoptera: Thripidae)

ZHANG Xiao-Chen, FENG Ji-Nian* (Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】To demonstrate spatio-temporal infection dynamics of *Wolbachia* in the poinsettia thrips, *Echinothrips americanus*.【Methods】Specific primers were designed based on the sequence of *Wolbachia* surface protein gene (*wsp*) to construct the standard plasmid. The absolute real-time quantitative PCR was used to determine the copy number of *wsp* in different developmental stages (egg, nymph, prepupa, pupa and adult) and adult tissues (head, thorax, abdomen and terminal three segments of abdomen) of both sexes of the thrips.【Results】The copy number of *Wolbachia* increased with the development of *E. americanus*, and the copy number of *Wolbachia* in female adult was significantly higher than those in egg and nymphal stages. The copy numbers of *Wolbachia* in different adult tissues were different. In female adults the copy number of *Wolbachia* in abdomen was significantly higher than those in head, thorax and the terminal three segments of abdomen, while in male adults the copy numbers in thorax and abdomen were significantly higher than those in head and the terminal three segments of abdomen. Sex and tissue had significant interactions with the copy number of *Wolbachia* in *E. americanus*.【Conclusion】The results indicate that the infection of *Wolbachia* in *E. americanus* is affected not only by the developmental stage of host, but also by host sex and tissue. This study provides a theoretical basis for understanding the occurrence, establishment and spreading of this thrips.

基金项目: 国家自然科学基金项目(3127344)

作者简介: 张晓晨, 女, 1984 年 10 月生, 河南项城人, 博士研究生, 研究方向为昆虫生态与害虫综合治理, E-mail: xiahu2010@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jinianf@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-01-03; 接受日期 Accepted: 2018-03-28

Key words: *Echinothrips americanus*; *Wolbachia*; *wsp*; spatio-temporal distribution; infection density; absolute real-time fluorescence quantitative PCR

Wolbachia(沃尔巴克氏体)是一类广泛分布于节肢动物体内的共生细菌,多为兼性共生,部分特化为专性共生(Kyei-Poku *et al*., 2006; Timmermans and Ellers, 2009; Zheng *et al*., 2011),可感染自然界中约70%的昆虫种类(Kozek and Rao, 2007),几乎涵盖了昆虫纲所有的目(Werren *et al*., 1995; Hilgenboecker *et al*., 2008)。*Wolbachia* 能引发宿主多种生殖异常行为,如雌性化(feminization)、孤雌生殖(parthenogenesis)和胞质不相容性(cytoplasmic incompatibility, CI)(Werren, 1997; Adachi-Hagimori *et al*., 2008)。*Wolbachia* 不仅能够调控宿主生殖,也能够影响宿主行为并改变宿主适合度(Rigaud and Rousset, 1996; Harris *et al*., 2010)。上述特征使 *Wolbachia* 有望被用于加强天敌昆虫的生殖率或降低害虫的生殖能力,或者作为一种媒介在昆虫种群中传播人为改变的遗传特征,以达到生物防治的目的(王成业, 2011; Ndii *et al*., 2015)。因此,*Wolbachia* 被认为在生物防治和遗传工程领域具有巨大的潜力,近年来迅速成为昆虫微生物学研究的热点。

了解 *Wolbachia* 在不同昆虫体内的分布状况,以及分布状况随昆虫发育的变化趋势,是对其利用和改造的基础。*Wolbachia* 主要集中在宿主生殖器官如卵巢和精巢中(Bordenstein *et al*., 2006),除此之外,在宿主的头、胸、血淋巴、中肠等各组织和器官中也有发现(Dobson *et al*., 1999; Veneti *et al*., 2004; Kusmintarsih, 2011)。现阶段,应用蛋白免疫印迹和 PCR 等研究技术,使得 *Wolbachia* 在宿主不同发育时期的分布变化得到进一步观察和研究(Landmann *et al*., 2010)。了解 *Wolbachia* 在宿主体内的分布及其时空变化规律,不仅有助于了解 *Wolbachia* 对宿主的影响,而且对于研究一些重要的进化进程,特别是对一些生殖方式与生活史复杂以及种群形成速度快的入侵害虫的种群形成机制与防治策略研究具有重要价值。

蓟马是一种体积小、为害隐蔽的农业害虫,具有多种孤雌生殖方式,如产雌孤雌生殖、产雄孤雌生殖及两者兼有的孤雌生殖方式(Oetting and Beshear, 1993),藉此在有限时间内迅速建立种群并扩增种群密度,快速完成对特定区域的入侵。采取上述3种生殖方式的蓟马均有与 *Wolbachia* 共生的种类(Kumm and Moritz, 2008)。Arakaki 等(2001)在缨翅目内发现 *Wolbachia* 可诱导细腰凶蓟马 *Franklinothrips vespiformis* 孤雌生殖的现象。在产雌孤雌生殖的花蓟马中 *Wolbachia* 的感染降低了其线粒体 DNA 的单倍型多样性和核苷酸多样性(王哲和乔格侠, 2011)。一些研究认为 *Wolbachia* 能够使原本应发育为雄性的未受精单倍体发育为雌性,以此诱导宿主进行产雌孤雌生殖(Adachi-Hagimori *et al*., 2008),对温室条蓟马 *Hercinothrips femoralis* 中 *Wolbachia* 的研究表明,*Wolbachia* 能使第一次有丝分裂过程中的染色体不分离,形成二倍体,最终导致孤雌产雌的发生(Kumm and Moritz, 2008)。综上所述,昆虫共生菌 *Wolbachia* 在蓟马生殖过程中起到了重要作用,研究 *Wolbachia* 在宿主体内的空间和时间上的拷贝数变化对于了解蓟马种群形成机制,进而针对其入侵机理制订防治策略具有重要意义。

美棘蓟马 *Echinothrips americanus* 属缨翅目(Thysanoptera)棘蓟马属 *Echinothrips*,原产美洲,是一种颇具威胁的入侵害虫(Opit *et al*., 1997; Varga and Fedor, 2008),主要危害温室蔬菜及观赏植物(Kaas, 2001; 张晓晨, 2010)。2010 年我国大陆地区首次报道了该害虫,随后迅速在北京和陕西关中地区定殖并建立自然种群(Mirab-Balou *et al*., 2010; 张晓晨, 2010)。美棘蓟马生殖方式为两性生殖与产雄孤雌生殖并行,*Wolbachia* 在其种群中感染率为100%,但其对种群的影响尚不得而知(Oetting and Beshear, 1993; Kumm and Moritz, 2008; Li *et al*., 2012)。本研究旨在通过研究美棘蓟马不同发育时期体内及成虫不同组织中 *Wolbachia* 的拷贝数变化,推测其在入侵种群中的生殖调控作用,为进一步了解该蓟马的发生、定植和扩散机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫获取与饲养

本研究所用美棘蓟马采自陕西杨陵地区周边温室内,将采集到的蓟马带回实验室镜检鉴定为美棘蓟马后(Stannard, 1968),置于人工气候箱(温度白天 27 ±0.5℃、夜晚 20 ±0.5℃;光周期 14L:10D;相对湿度 45% ~55%)内的水培小麦上进行饲养 5 ~10 代,作为稳定的实验种群使用。

1.2　样品的采集与处理

1.2.1　卵及不同龄期美棘蓟马的采集：从种群内随机取 20 头雌虫转移至事先放于试管内的小麦叶片上（小麦叶片已检查过无其他昆虫及卵），24 h 后移走成虫，在有雌虫产卵的叶片上随机选择 3 组卵（每组 4 粒），分别放入 100% 酒精待提取 DNA。从美棘蓟马实验种群中随机采集美棘蓟马 1－2 龄若虫、预蛹、蛹及雌雄成虫各 3 头为一组作为一个生物学重复，共 3 个生物学重复，分别放入 100% 酒精待提取 DNA。

1.2.2　美棘蓟马不同组织样品的采集：从实验种群内随机采集美棘蓟马雌雄成虫各 9 头，在体视显微镜下用刀片将其分为头、胸、腹 3 段，头、胸各取 3 个为一组，腹部 3 头各为一组，余下的 6 个腹部在显微镜下将腹部末端的 8－10 节切下，两个一组。每组作为一个生物学重复，共 3 个生物学重复，分别放入 100% 酒精以供后续 DNA 提取。

1.3　总 DNA 的提取

1.2 节收集样品的的每个样品进行总 DNA 提取，使用杭州 BIOER 公司 Biospin 组织基因组 DNA 提取试剂盒。实验操作参照说明书。对提取的各样品总 DNA 进行电泳检测提取质量后放入－20℃保存或立即用于 PCR 扩增。

1.4　标准质粒构建

以 1.3 节提取的美棘蓟马 DNA 为模板，进行 *Wolbachia* 外膜蛋白（*Wolbachia* surface protein，wsp）基因（GenBank 登录号：JN315668）片段的扩增，引物为 wsp 81F（5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′）和 wsp 691R（5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′）。反应体系：10×Ex Taq PCR Buffer（Mg^{2+} plus）2.5 μL，dNTP Mixture（each 2.5 mmol/L）2 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，DNA 模板 0.5 μL，Ex Taq（5 U/μL）0.2 μL，ddH_2O 补充至 25 μL。反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 1 min，55℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；72℃延伸 10 min，12℃保存。

PCR 产物用 Biospin Gel Extraction Kit（杭州 BIOER 公司）纯化试剂盒进行纯化，连入 pMD18-T（TaKaRa，大连），转入大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 中，涂布于含 100 μg/mL Amp/X-gal/IPTG 的 LB 平板培养基上，培养后挑取单克隆，PCR 鉴定片段大小正确后，送测序。以测序正确的单克隆为菌种，1∶100（v/v）接种到 LB（含氨苄青霉素 100 μg/L）中，检测 OD_{600}＝0.6～0.8 时，提取质粒，作为标准质粒。

1.5　实时荧光定量 PCR 测定美棘蓟马体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因拷贝数

本实验使用康为世纪生物科技有限公司 UltraSYBR Mixture（with ROX II）的荧光定量试剂盒，仪器为美国伯乐的 IQ5 iCycler iQ Real-Time PCR Detection System，将 1.3 节提取的美棘蓟马不同发育期及不同组织样品 DNA 都定量至同一浓度进行 *Wolbachia wsp* 基因拷贝数检测。

基于 1.4 节扩增的 *wsp* 基因片段序列，利用 Primer 5.0 软件及 NCBI 网站上的引物设计工具（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast）设计定量 PCR 的特异引物（Wf1：5′-TTTGGAACCCGCTGTGAATG-3′；Wr1：5′-ATGCGCCTGCATCAGTAACC-3′），扩增目标片段产物长度为 170 bp。将 1.4 节制备好的梯度标准质粒 DNA 按 10 倍梯度稀释 6 个浓度，以此为模板绘制标准曲线，设 3 个重复。以质粒拷贝数对数为横坐标，以 PCR 反应的循环数（Ct）为纵坐标绘制标准曲线。定量 PCR 的反应体系为 25 μL：2×Ultra SYBR Mixture 12.5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，稀释后的标准质粒或者 1.3 节提取的美棘蓟马不同发育期及不同组织样品 DNA 1 μL，去离子水 10.5 μL。阴性对照为反应体系中用去离子水代替模板 DNA。检测采用三步法，热循环条件：95℃预变性 10 min；95℃变性 10 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 32 s，共 40 个循环。每个生物学重复设置 3 个技术重复。

测序及引物合成服务由北京奥科鼎盛生物科技公司和生工生物工程（上海）股份有限公司提供。

1.6　数据分析

定量 PCR 数据输出后，对照标准曲线将其转换为基因拷贝数后进行分析，相关差异显著性由 SPSS 18.0 软件（SPSS Inc.，Chicago，IL，美国）进行多重比较（LSD 法，$\alpha=0.05$）进行。拷贝数计算公式：质粒拷贝数（copies/μL）＝6.02×10^{23}（copies/mol）×质粒浓度（g/μL）/质粒分子量（g/mol）（李慧锋等，2010）。

2　结果

2.1　*wsp* 基因绝对定量标准曲线的绘制

通过实时定量 PCR 的扩增，依据 Ct 值与质粒拷贝数对数生成 *wsp* 基因的标准曲线（图 1），回归方程为 $y=-3.4487x+60.221$，扩增效率 $E=$

95.0%，相关系数 $R^2=0.9652$，扩增效率在 0.95 ~ 1.10 之间，且曲线相关性良好，说明在线性质粒稀释质量浓度范围内有良好的线性关系，本标准曲线能够准确的反应目的产物扩增。

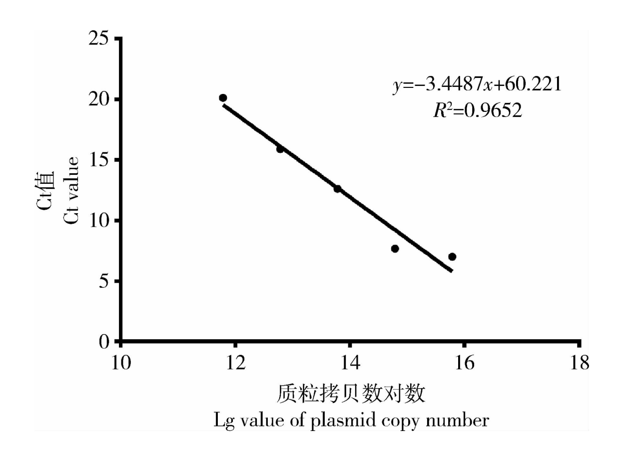


图 1　实时定量 PCR 检测中共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的标准曲线

Fig. 1　Standard curve of *wsp* gene of *Wolbachia* in qPCR assay

2.2　共生菌 *Wolbachia* 在不同龄期美棘蓟马体内的分布

将通过定量 PCR 得到的不同龄期美棘蓟马样品的 Ct 值带入标准曲线，各重复计算均值得到该样品的 *wsp* 基因拷贝数（图 2）。因 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因是单拷贝基因，所以 *wsp* 基因拷贝数作为 *Wolbachia* 拷贝数。对数据进行整理后用 SPSS 软件进行多重比较（LSD 法，$\alpha=0.05$），美棘蓟马雌成虫体内共生菌 *Wolbachia* 拷贝数的平均值与该蓟马卵和 1 - 2 龄若虫体内的拷贝数相比差异显著。在初始的卵期和 1 龄若虫期，美棘蓟马体内的 *Wolbachia* 的拷贝数均值很低（7×10^8 ~ 8×10^8 copies），低于 2 龄若虫体内拷贝数的 50%；经过 2 龄若虫期的取食后，预蛹期美棘蓟马体内 *Wolbachia* 拷贝数近 1 龄若虫体内拷贝数的 10 倍（均值 8.5×10^9 copies 左右）；蛹内 *Wolbachia* 的拷贝数均值 2.1×10^{10} copies 左右；进入成虫期后美棘蓟马雌虫体内的 *Wolbachia* 拷贝数均值为 2.85×10^{10} copies，雄虫体内拷贝数均值为 1.74×10^{10} copies，约占雌虫体内拷贝数的 60%。

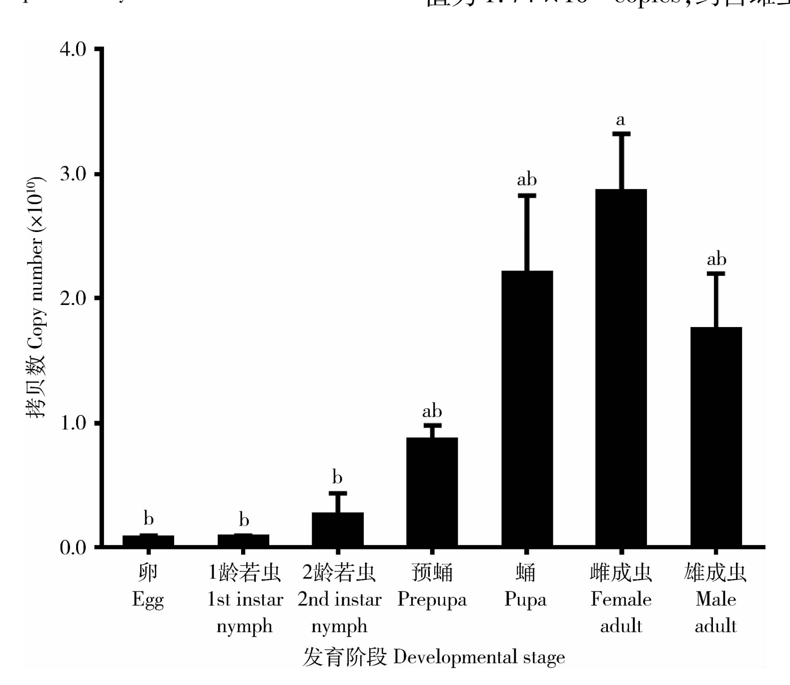


图 2　*Wolbachia* 的 *wsp* 基因在不同发育阶段美棘蓟马体内的拷贝数

Fig. 2　Copy number of *wsp* gene of *Wolbachia* in *Echinothrips americanus* of different developmental stages

图中数据为平均值 ± 标准误，柱上不同字母表示 *Wolbachia wsp* 基因在美棘蓟马不同发育阶段拷贝数的多重比较（LSD 法，$\alpha=0.05$）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant differences in copy number of *Wolbachia wsp* gene in the different developmental stages by LSD analysis ($\alpha=0.05$).

2.3　共生菌 *Wolbachia* 在美棘蓟马成虫体内不同组织中的分布

由图 3 可知，共生菌 *Wolbachia* 在美棘蓟马成虫体内不同组织的分布存在差异，两性成虫均是腹部的 *Wolbachia wsp* 基因拷贝数最高，腹末 3 节和胸部次之，头部最低。在每个性别内对其进行多重比较（LSD 法），结果显示美棘蓟马雌虫腹部 *Wolbachia* 的拷贝数显著高于胸部、头部和腹末 3 节的拷贝数

($\alpha = 0.05$)；雄性个体的腹部和胸部内 *Wolbachia* 的拷贝数显著高于头部和腹末 3 节($\alpha = 0.05$)。美棘蓟马雌性腹部内的 *Wolbachia* 拷贝数约占全身总量的一半，腹末 3 节的 *Wolbachia* 平均拷贝数占整个腹部的平均拷贝数 40% 左右；雄性美棘蓟马腹部的 *Wolbachia* 拷贝数约占全身总量的 1/3，腹末 3 节的 *Wolbachia* 拷贝数占整个腹部的 1/3 左右。对其进行双因素多重比较分析($\alpha = 0.05$，表 1)，结果显示性别和组织对美棘蓟马体内 *Wolbachia* 拷贝数的影响均达到显著水平，上述两因素与美棘蓟马身体各部分的 *Wolbachia* 拷贝数存在显著的交互作用($\alpha = 0.007 < 0.05$)。

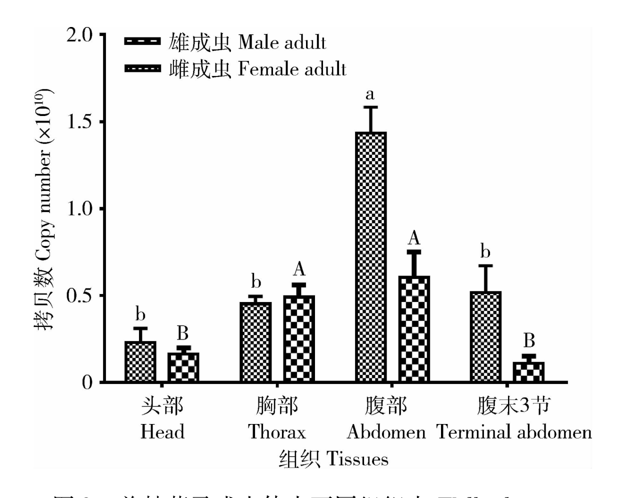


图 3　美棘蓟马成虫体内不同组织中 *Wolbachia wsp* 基因的拷贝数

Fig. 3　Copy number of *Wolbachia wsp* gene in different tissues of *Echinothrips americanus* adults

柱上不同小写字母表示雌虫体内不同组织中 *Wolbachia wsp* 基因拷贝数经 LSD 多重比较差异显著；不同大写字母表示雄虫体内不同组织中 *Wolbachia wsp* 基因拷贝数经 LSD 多重比较差异显著($\alpha = 0.05$)。Different small letters above bars indicate significant difference in copy number of *Wolbachia wsp* gene among different tissues in female adult by LSD analysis, while different capital letters indicate significant difference among different tissues in male adult by LSD analysis ($\alpha = 0.05$).

表 1　美棘蓟马性别和组织对其体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 拷贝数的影响($\alpha = 0.05$)

Table 1　Effects of sex and tissues of *Echinothrips americanus* on the copy number of *Wolbachia wsp* gene ($\alpha = 0.05$)

变异来源 Source of variance	自由度 *df*	*F* 值 *F* value	*P* 值 *P* value
性别 Sex	1	15.788	0.001
组织 Tissues	3	21.477	0.000
交互作用 Interaction	3	5.734	0.007
误差 Error	17		

3　讨论

本研究结果表明，美棘蓟马体内感染的 *Wolbachia* 拷贝数会随宿主不同发育阶段细胞的增殖而逐渐增多，且成虫不同组织中 *Wolbachia* 拷贝数有较大差异，性别和组织位置与 *Wolbachia* 拷贝数有交互作用。

之前的研究证实，*Wolbachia* 很可能是一个基因组的单拷贝，因此其在宿主体内的分布与密度可以通过测量目标基因的数量来估计(Baldo *et al*., 2005；Roy *et al*., 2015)。*wsp* 基因作为编码 *Wolbachia* 表面蛋白的基因，被广泛用于检测 *Wolbachia* 感染及分型研究(Braig *et al*., 1998；Hoffmann *et al*., 2014)，因此我们选择 *wsp* 基因作为测量 *Wolbachia* 的目标基因。

美棘蓟马各发育阶段中的共生菌 *Wolbachia* 拷贝数随龄期的增长而增长，美棘蓟马卵期和 1 龄若虫期的拷贝数相近，在主要取食阶段且历期较长的美棘蓟马 2 龄若虫体内的 *Wolbachia* 并没有随宿主体型的增大而迅速复制增加；进入不能取食活动的预蛹期，虽然此时的 *Wolbachia* 拷贝数是 2 龄若虫期的 2～3 倍，可能由于组内差异过大的原因，两者却并没有显著差异。蛹期美棘蓟马多数会移动至叶腋或叶片下面的主叶脉旁静止，不再取食，此时期的 *Wolbachia* 拷贝数为预蛹期的 1.5～2 倍。美棘蓟马的蛹期较短，仅为 1～2 d，但 *Wolbachia* 在此期间却有着爆发式的增长，我们推测是伴随着蛹期美棘蓟马体内的器官和组织重组，*Wolbachia* 获得了自身增殖的最佳时期。*Wolbachia* 的这种增殖和寄主的营养状况有关，并且宿主对共生菌的反应和免疫也调节着发育过程中的共生菌含量变化(Fraune and Bosch, 2010；Douglas *et al*., 2011；Ratzka *et al*., 2012)。上述研究结果与蚜虫 *Schizaphis graminum*、柑橘木虱 *Diaphorina citri* 等发育期间的共生菌研究结果相似(Baumann and Baumann, 1994；Dossi *et al*., 2014)，与美洲大蠊 *Periplaneta americana* 和杂拟谷盗 *Tribolium confusum* 相关研究中的结果不一致(Sacchi *et al*., 1996；沈加飞等, 2016)。共生菌在宿主体内的增殖是一个动态的变化过程，我们推测 *Wolbachia* 在可能是由于宿主代谢需求的增长而进行的自身增殖，而且 *Wolbachia* 在不同发育时期的变化受宿主细胞增殖的影响。由于美棘蓟马成虫前各发育阶段历期较短，所以本研究仅分析了某一龄

期内的“静止”值而未涉及同一龄期内 *Wolbachia* 拷贝数变化，在对柑橘木虱的相关研究中发现，同一龄期内 *Wolbachia* 的含量会随日龄不断增长，在若虫最后龄期，体内共生菌增殖速度加快（Dossi *et al*., 2014）。这也可以解释美棘蓟马在 1 龄若虫期与 2 龄若虫期、2 龄若虫期与预蛹期之间虽然 *Wolbachia* 的拷贝数均值差异较大，但却没有出现显著差异的原因。

与自然感染 *Wolbachia* Dib 群的柑橘木虱种群中雄性体内的 *Wolbachia* 拷贝数高于雌性不同（Hoffmann *et al*., 2014），本研究中美棘蓟马雄性体内的 *Wolbachia* 拷贝数仅为雌性个体拷贝数的 60% ~ 70%，说明共生菌 *Wolbachia* 可能更多聚集在美棘蓟马雌性体内。张慧等（2010）在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中也发现无论长短翅型雌性体内的 *Wolbachia* 密度均高于雄性。和果蝇 *Drosophila simulans*（Dobson *et al*., 1999）中的研究结果类似，雌虫中的 *Wolbachia* 感染密度高于雄虫，在不同发育阶段雌虫中的 *Wolbachia* 的变化也比雄虫显著。故而推断 *Wolbachia* 在雌虫中可能发挥更大的作用，如参与雌性体内卵的生成、促进卵的正常孵化或诱导卵的发育缺陷（Timmermans and Ellers, 2009; Kageyama *et al*., 2017）。由于共生菌 *Wolbachia* 参与宿主生殖调控，在产卵前后 *Wolbachia* 的密度也会有相应变化来补充其产卵带来的损失，如雌虫体内的 *Wolbachia* 在产卵后会增加（Dossi *et al*., 2014），我们推测 *Wolbachia* 对美棘蓟马的调控作用存在性别差异。此外，雄性成虫体内 *Wolbachia* 拷贝数均值同时也低于蛹中拷贝数均值，鉴于雌性个体与雄性个体各组织 *Wolbachia* 拷贝数的差异（图 3），推测取样时可能更多取到了雌性的蛹而造成此种偏差，但由于美棘蓟马成虫前期无法分辨性别，该验证可能需要其他更深入的实验手段和技术。

Wolbachia 拷贝数在美棘蓟马成虫头部最低，胸部次之，腹部最高，三者均达到了显著差异（$P < 0.05$，图 3）。由于解剖学的难度未解剖出美棘蓟马具体的生殖腺体或消化道，仅将被认为聚集了多数生殖相关腺体的雌雄虫腹末 3 节（8 – 10 节）内的 *Wolbachia* 拷贝数进行了比较，美棘蓟马雌虫腹部末节内 *Wolbachia* 拷贝数占整个腹部的 1/3 ~ 1/2，推测其生殖腺感染了较多的共生菌 *Wolbachia*，在解剖尝试及电镜切片中发现雌虫开始产卵后其卵巢长度能达到腹部第 4 – 5 节，推测其生殖腺内感染共生菌 *Wolbachia* 的拷贝数比本研究测得的数值还要高。雌性美棘蓟马腹部 *Wolbachia* 拷贝数占整个虫体的一半多，雄性仅约占 1/3，推测其生殖腺感染了较多的共生菌 *Wolbachia* 且美棘蓟马种群中 *Wolbachia* 的扩散仅能通过垂直传播，所以雌虫腹部的 *Wolbachia* 拷贝数比重要大于雄虫。对造成美棘蓟马不同组织中 *Wolbachia* 拷贝数差异的原因进行双因素方差分析（表 1），性别因素和不同组织都显著地造成了这种差异，而且两者间的交互作用对美棘蓟马体内 *Wolbachia* 的分布影响显著。McGraw 等于 2002 年对果蝇进行研究后也推测，*Wolbachia* 在宿主不同组织内的复制率是彼此独立的，且由于自然选择的压力其功能往往集中于宿主的繁殖适合度上（McGraw *et al*., 2002）。说明 *Wolbachia* 对美棘蓟马的两性成虫可能有着不一样的调控作用；其在腹部的聚集也与对应的器官功能相适应，推测 *Wolbachia* 对雌性美棘蓟马的生殖有着一定的影响。

共生菌在昆虫体内的密度受环境温度、种群密度、宿主龄期、营养情况及免疫程度等多方面的影响（Wolschin *et al*., 2004; Ratzka *et al*., 2012）。本研究分析了美棘蓟马在不同发育阶段、不同性别和不同组织中 *Wolbachia* 感染密度，明确了 *Wolbachia* 在美棘蓟马体内的时空分布动态及影响因素，以此对 *Wolbachia* 在美棘蓟马种群中的作用进行预测，为进一步以此为依据对不同发育阶段的美棘蓟马进行更细分的 *Wolbachia* 密度测定或针对某些器官或组织的 *Wolbachia* 密度研究奠定基础，这些对于揭示寄主与共生菌之间的互作关系具有重要意义。

参考文献（References）

Adachi-Hagimori T, Miura K, Stouthamer R, 2008. A new cytogenetic mechanism for bacterial endosymbiont-induced parthenogenesis in Hymenoptera. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 275(1652): 2667 – 2673.

Arakaki N, Miyoshi T, Noda H, 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Fanklintothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 268 (1471): 1011 – 1016.

Baldo L, Lo N, Werren J, 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *J. Bacteriol.*, 187(15): 5406 – 5418.

Baumann L, Baumann P, 1994. Growth kinetics of the endosymbiont *Buchnera aphidicola* in the aphid *Schizaphis graminum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(9): 3440 – 3444.

Bordenstein SR, Marshall ML, Fry AJ, Kim U, Wernegreen JJ, 2006. The tripartite associations between bacteriophage, *Wolbachia*, and arthropods. *PLoS Pathog.*, 2(5): 384 – 393.

Braig H, Zhou W, Dobson S, O' Neill S, 1998. Cloning and

characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol*., 180(9): 2373 – 2378.

Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou WG, Rousset F, O'Neill SL, 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol*., 29(2): 153 – 160.

Dossi FCA, da Silva EP, Cônsoli FL, 2014. Population dynamics and growth rates of endosymbionts during *Diaphorina citri* (Hemiptera, Liviidae) ontogeny. *Microb. Ecol*., 68(4): 881 – 889.

Douglas A, Bouvaine S, Russell R, 2011. How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*., 278(1704): 333 – 338.

Fraune S, Bosch T, 2010. Why bacteria matter in animal development and evolution. *BioEssays*, 32(7): 571 – 580.

Harris HL, Brennan LJ, Keddie BA, Braig HR, 2010. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. *Symbiosis*, 51(1): 37 – 53.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren J, 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett*., 281(2): 215 – 220.

Hoffmann M, Coy M, Gibbard HK, Pelz-Stelinski K, 2014. *Wolbachia* infection density in populations of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). *Environ. Entomol*., 43(5): 1215 – 1222.

Kaas JP, 2001. Scouting for thrips – the development of a time saving sampling program for *Echinothrips*. *Proc. Exp. Appl. Entomol*., 12: 85 – 90.

Kageyama D, Wang CH, Hatakeyama M, 2017. *Wolbachia* infections of the butterfly *Eurema mandarina* interfere with embryonic development of the sawfly *Athalia rosae*. *J. Invertebr. Pathol*., 150 (Suppl. C): 76 – 81.

Kozek W, Rao RU, 2007. The discovery of *Wolbachia* in arthropods and nematodes – a historical perspective. In: Hoerauf A, Rao RU eds. *Wolbachia*: A Bug's Life in Another Bug. Issues in Infectious Diseases, Vol. 5. Basel, Karger. 1 – 14.

Kumm S, Moritz G, 2008. First detection of *Wolbachia* in arrhenotokous populations of thrips species (Thysanoptera: Thripidae and Phlaeothripidae) and its role in reproduction. *Environ. Entomol*., 37(6): 1422 – 1428.

Kusmintarsih ES, 2011. Ultrastucture of *Wolbachia* are found in somatic and reproductive tissue of *Drosophila simulans* and *D. melanogaster*. *Microbiol. Indones*., 5(1): 33 – 38.

Kyei-Poku GK, Giladi M, Coghlin P, Mokady O, Zchori-Fein E, Floate KD, 2006. *Wolbachia* in wasps parasitic on filth flies with emphasis on *Spalangia cameroni*. *Entomol. Exp. Appl*., 121(2): 123 – 135.

Landmann F, Slatko B, Foster JM, Sullivan W, 2010. Asymmetric *Wolbachia* segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. *PLoS Negl. Trop. Dis*., 4(7): e758.

Li HF, Li L, Zhang LJ, Xu YL, Li WF, 2010. Standard curve generation of *PepT*1 gene for absolute quantification using real-time PCR. *J. Shanxi Agric. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 30(4): 332 – 335. [李慧锋，李丽，张丽娟，徐玉良，李武峰，2010. *Pep T*1 基因绝对荧光定量 PCR 标准曲线的建立. 山西农业大学学报(自然科学版)，30(4)：332 – 335]

Li XW, Zhang XC, Jiang HX, Feng JN, 2012. Comparisons of developmental and reproductive biology between parthenogenetic and sexual *Echinothrips americanus* (Thysanoptera: Thripidae). *Environ. Entomol*., 41(3): 706 – 713.

McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O'Neill SL, 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(5): 2918 – 2923.

Mirab-Balou M, Lu H, Chen XX, 2010. First record of *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera, Thripidae) in mainland China. *Acta Zootaxon. Sin*., 35(3): 674 – 679.

Ndii MZ, Hickson RI, Allingham D, Mercer GN, 2015. Modelling the transmission dynamics of dengue in the presence of *Wolbachia*. *Math. Biosci*., 262: 157 – 166.

Oetting RD, Beshear RJ, 1993. Biology of the greenhouse pest *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae). *Int. J. Pure Appl. Zool*., 4: 307 – 315.

Opit GP, Peterson B, Gillespie DR, Costello RA, 1997. The life cycle and management of *Echinothrips americanus*. *J. Entomol. Soc. Brit. Columba*, 94: 3 – 6.

Ratzka C, Gross R, Feldhaar H, 2012. Endosymbiont tolerance and control within insect hosts. *Insects*, 3(4): 553 – 572.

Rigaud T, Rousset F, 1996. What generates the diversity of *Wolbachia*-arthropod interactions? *Biodivers. Conserv*., 5(8): 999 – 1013.

Roy V, Girondot M, Harry M, 2015. The distribution of *Wolbachia* in *Cubitermes* (Termitidae, Termitinae) castes and colonies: a modelling approach. *PLoS ONE*, 10(2): e0116070.

Sacchi L, Corona S, Grigolo A, Laudani U, Selmi M, Bigliard E, 1996. The fate of the endocytobionts of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae) and *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) during embryo development. *Ital. J. Zool*., 63(1): 1 – 11.

Shen JF, Ming QL, Cheng C, Liu CM, Feng ZJ, 2016. The temporal and spatial distribution status of *Wolbachia* infection density in the confused flour beetle *Tribolium confusum*. *J. Environ. Entomol*., 38(2): 378 – 383. [沈加飞，明庆磊，程超，刘缠民，冯照军，2016. 杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 感染密度的时间和空间分布状况. 环境昆虫学报，38(2)：378 – 383]

Stannard LJ, 1968. The thrips, or Thysanoptera, of Illinois. *Bull. Illinois Nat. Hist. Survey*, 29: 307 – 308.

Timmermans M, Ellers J, 2009. *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evol. Ecol*., 23(6): 931 – 942.

Varga L, Fedor PJ, 2008. First interception of the greenhouse pest *Echinothrips americanus* Morgan, 1913 (Thysanoptera: Thripidae) in Slovak Republic. *Plant Prot. Sci*., 44(4): 155 – 158.

Veneti Z, Clark ME, Karr TL, Savakis C, Bourtzis K, 2004. Heads or tails: host-parasite interactions in the *Drosophila-Wolbachia* system. *Appl. Environ. Microb*., 70(9): 5366 – 5372.

Wang CY, 2011. Genetic mechanism and evolutionary significance of the

origin of parthenogenetic insects. *Zool. Res.*, 32(6): 689-695. [王成业, 2011. 昆虫孤雌生殖起源的遗传机制和进化意义. 动物学研究, 32(6): 689-695]

Wang Z, Qiao GX, 2011. Current research trends on the endosymbiont *Wolbachia* in insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(6): 1823-1834. [王哲, 乔格侠, 2011. *Wolbachia* 与昆虫寄主关系研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1823-1834]

Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587-609.

Werren JH, Windsor D, Guo LR, 1995. Distriution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 262(1364): 197-204.

Wolschin F, Holldobler B, Gross R, Zientz E, 2004. Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7): 4096-4102.

Zhang H, Zhang KJ, Hong XY, 2010. Infection density of *Wolbachia* in different tissues of macropters and brachypters adults of *Nilaparvata lugens* (Stål). *J. Nanjing Agric. Univ.*, 33(5): 35-39. [张慧, 张开军, 洪晓月, 2010. 褐飞虱长短翅型成虫不同组织内 *Wolbachia* 的密度. 南京农业大学学报, 33(5): 35-39]

Zhang XC, 2010. New Record of *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae) in China Mainland and Its Biology. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [张晓晨, 2010. 中国大陆新记录种美棘蓟马 *Echinothrips americanus* Morgan 及其生物学研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]

Zheng Y, Wang JL, Liu C, Wang CP, Walker T, Wang YF, 2011. Differentially expressed profiles in the larval testes of *Wolbachia* infected and uninfected *Drosophila*. *BMC Genomics*, 12: 595.

(责任编辑: 马丽萍)